

## Identificación preliminar de microflora bacteriana en el compartimiento 1 del sistema digestivo en alpacas (*Vicugna pacos*)

Jorge Rodríguez<sup>1,2,\*</sup>, Fernando Carcelen<sup>1</sup>, Juan Agapito<sup>3</sup>, Teresa Barreto<sup>2</sup>, Carolina Rodríguez<sup>1</sup>, Felipe San Martín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal – Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Circunvalación cda 29 S/N, Lima 41, Perú

<sup>2</sup> Unidad de Biotecnología Molecular – Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú

<sup>3</sup> Laboratorio de Genómica, Instituto Peruano de Energía Nuclear  
Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

### Resumen

Un estudio preliminar de identificación de bacterias presentes en el compartimiento 1 de alpacas Huacaya fue realizado. Fragmentos de 728 bases del gen 16S rDNA fueron amplificados mediante PCR. Los productos de PCR fueron clonados en un vector de expresión PGEM-T (Promega), transformados en *Escherichia coli* JM109 y secuenciados en un analizador genético ABI 3130. El análisis de 32 secuencias del gen 16S rDNA indicaron altos grados de similaridad (> 95%, > e-140) con secuencias de bacterias previamente descritas en bases de datos del GeneBank, Blast server for bacterial identification, Ribosomal database project y BiBi database. Sin embargo, un 25 % de las secuencias no mostraron similaridad con secuencias bacterianas descritas previamente. Los resultados indican la presencia de *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus bromi*, *Clostridium thermocellum*, *Succinoclasticum ruminis*, *Sporobacter termitidis*, *Fastidiosipila sanguinis* y sugieren la presencia de bacterias no descritas a la fecha en el compartimiento 1 de la alpaca.

### Abstract

A preliminary study on identification of bacteria present in compartment 1 of Huacaya alpacas was performed. Fragments of 728 bases of 16S rDNA gene were amplified using PCR. PCR products were cloned into an pGEM-T (Promega) expression vector, transformed into *Escherichia coli* JM109 and sequenced in an ABI 3130 Genetic Analyzer. The analysis of 32 16S rDNA sequences indicated a high degree of similarity (> 95% ,> e-140) with sequences of bacteria previously described in the GenBank database, Blast server for bacterial identification, Ribosomal Database Project and BiBi database. However, 25 % of sequences do showed similarity with any bacterial sequences described in bacterial database. The results indicate presence of *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus bromi*, *Clostridium thermocellum*, *Succinoclasticum ruminis*, *Sporobacter termitidis*, *Fastidiosipila sanguinis* and suggest the presence of bacteria not yet described in the alpaca compartment 1.

### 1. Introducción

La caracterización de la microbiota gastrointestinal en animales domésticos es la primera etapa en el desarrollo de biotecnologías aplicadas a la nutrición animal.

Tradicionalmente la microbiota bacteriana ha sido estudiada mediante cultivo, lo cual requería una intensa labor e información sobre requerimientos nutricionales y de crecimiento bacterianos. Estos métodos han sido sustituidos por técnicas moleculares, basadas en la amplificación y secuenciamiento de fragmentos del gen

ribosomal 16S [1,2]. El gen ribosomal 16S se encuentra presente en todos los genomas bacterianos, es altamente conservado y posee una extensión de aproximadamente 1.5 Kb [1]. Su estructura incluye regiones conservadas y altamente variables intercaladas, lo cual permite la identificación de géneros y especies bacterianas mediante la amplificación y secuenciamiento del gen [10].

La caracterización molecular de la microflora

---

\* Correspondencia autor: jorge.rodriguez.b@upch.pe

bacteriana se ha realizado con éxito en diferentes especies domésticas, como perros [3] conejos [4], ganado bovino [5]; sin embargo, se carece de reportes sobre especies bacterianas presentes en el compartimiento 1 de la alpaca.

## 2. Materiales y Método

ADN plasmídico fue extraído de 50 clonas mediante Miniprep Plasmid DNA (Promega) y se amplificaron los fragmentos insertados mediante PCR. Los insertos fueron secuenciados en ambas direcciones (5' - 3' y 3' - 5') usando ABI PRISM Big Dye Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit y un secuenciador automático ABI PRISM 3130 Genetic Analyser®.

La edición de las secuencias y alineamiento se realizó mediante Mega v4.0 [9]. Las secuencias de ADN fueron comparadas directamente con las bases de datos del GeneBank mediante el uso del programa BLASTN ([www.ncbi.nih.nlm.gov](http://www.ncbi.nih.nlm.gov)), Blast server for bacterial identification ([www.bioinfo.unice.fr/bblast/](http://www.bioinfo.unice.fr/bblast/)), Ribosomal database project ([http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)) y BiBi database (<http://umr5558-mq1.univ-lyon1.fr/qm?page=BibiDataBases>) para identificar género y especie bacteriano en base a la similitud de secuencia (>95%), e-value (e-140) y a su origen filogenético [10].

## 3. Resultados y Discusión

Un total de 32 secuencias únicas de un fragmento de 728 bp del gen 16S rDNA fueron obtenidas a partir de 50 colonias picadas y secuenciadas. El análisis de las 32 secuencias del gen 16S rDNA permitieron la identificación de bacterias en base a la similitud de secuencias, e-value y a origen filogenético [10]. Se identificaron 7 especies bacterianas previamente descritas en bases de datos del GeneBank, Blast server for bacterial identification, Ribosomal database project y BiBi database: *Succiniclasicum ruminis* (X81137; e-176; 95% similitud), *Sporobacter termitidis* (Z49863; e-143; 96% similitud), *Fastidiosipila sanguinis* (e-156, 95% similitud), *Ruminococcus flavefaciens* (AM915271; e-166; 95% similitud), *Ruminococcus bromi* (L76600 ; e-174; 94% similitud) y *Clostridium thermocellum* (FJ599513; e-141; 95% similitud). Sin

embargo, un 25% de las secuencias no mostraron similitud con secuencias bacterianas (< 86% similitud, < e-80) descritas previamente.

## 4. Conclusiones

Los resultados preliminares indican la presencia de *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus bromi*, *Clostridium thermocellum*, *Succiniclasicum ruminis*, *Sporobacter termitidis*, *Fastidiosipila sanguinis* y sugieren la presencia de bacterias no descritas a la fecha en el compartimiento 1 de la alpaca. Se recomienda continuar con el secuenciamiento de más clonas a partir de la biblioteca de genes 16S rDNA elaborada.

## 5. Agradecimientos

A la Dra. Rosa Gonzáles del Laboratorio de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria –UMSM.

Al Dr. Arnaldo Alvarado, Ing. Juan Olazabal, y a los estudiantes Roxana Mires y Josmel Pacheco del Laboratorio de Bioquímica y Nutrición Animal.

Al Blgo. Marco Espinoza por las facilidades brindadas en su laboratorio del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN).

Al Laboratorio de Genómica del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN).

Este trabajo ha sido financiado por el Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

## 6. Bibliografía

- [1] Zoetendal E, *et al.* Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *J Nutr.* 2004; 134(2):465-72.
- [2] Makkar H & McSweeney C. *Methods in gut microbiol ecology for ruminants.* New York: Springer; 2005.
- [3] Vanhoutte T, Huys G, De Brandt E, Fahey GC Jr, Swings J. Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiol.* 2005; 249(1):65-71.
- [4] Linaje R, *et al.* Characterization of faecal enterococci from rabbits for the selection of

probiotic strains. *J Appl Microbiol.* 2004; 96(4):761-71.

[5] Tajima K, Aminov R, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, Benno Y. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology.* 1999; 29:159-169.

[6] Wilson K, Blitchington R. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62:2273-78.

[7] Pryde S, *et al.* Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen and cecal lumen of a pig. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:5372-77.

[8] Abecia L, Fondevila M, Balcells J, Edwards J, Newbold J, McEwan N. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters.* 2005; 244:111-115.

[9] Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 2007; 24: 1596-99.

[10] Mignard S, Flandrois J. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods.* 2006; 67:574-81.